

BAB 4

METODE PENELITIAN

1.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian jenis *True Experimental Research* yang menggunakan desain penelitian *Post Test Control Group Design*.

1.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi Penelitian : Laboratorium Biomedik dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

Waktu Penelitian : 6 – 27 Mei 2019 selama 22 hari

1.3. Populasi dan Sampel

4.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*).

4.3.2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain wistar*) yang sesuai dengan kriteria inklusi.

4.3.3. Besar Sampel

Penentuan besar sampel ditentukan dengan rumus : (Arifin & Zahiruddin, 2017)

Degrees of Freedom (DF) = 10 (minimum) – 20 (maksimum)

Dengan rumus : $(r \times k) - k$

Maka dapat diperoleh :

$$\text{Minimum: } 10 = (r \times 5) - 5$$

$$15 = 5r$$

$$r = 3$$

$$\text{Maksimum: } 20 = (r \times 5) - 5$$

$$25 = 5r$$

$$r = 5$$

Keterangan:

k = kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi (pengulangan)

Dibutuhkan 3 – 5 ekor untuk setiap kelompok perlakuan.

4.3.4. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan *simple random sampling*, yaitu pengambilan sampel dari populasi yang dianggap homogen berdasarkan kriteria tertentu yakni kriteria inklusi yang sudah ditetapkan. Pengambilan subjek penelitian dapat dilakukan dengan undian maupun bilangan random (Prihanti, 2016).

4.3.5. Karakteristik Sampel Penelitian

1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus putih (*Rattus novergicus strain wistar*)
- b. Umur 2-3 bulan
- c. Berat badan 150 – 200 gram
- d. Jenis kelamin jantan
- e. Sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, bulu tebal, dan matanya jernih

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang sakit sebelum penelitian
- b. Tikus yang stress sebelum penelitian
- c. Tikus yang pernah digunakan untuk penelitian

3. Kriteria *drop out*

Tikus yang sakit, mati, atau hilang selama penelitian

4.3.6. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar malondialdehid (MDA) plasma

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah paparan timbal asetat.

4.3.7. Definisi Operasional

1. Ekstrak meniran

Ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L.) adalah herba meniran yang diperoleh dari Materia Medika Batu, Jawa Timur yang diekstrak secara maserasi kinetik dengan menggunakan pelarut etanol 60% sehingga diperoleh ekstrak etanol meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Ekstrak meniran diberikan dengan dosis

20 mg/200gBB/hari, 40 mg/200 gBB/hari, dan 80 mg/200gBB secara sonde peroral, 1 kali sehari selama 14 hari.

2. Paparan timbal

Timbal asetat adalah senyawa berbentuk kristal putih dan memiliki rasa manis yang dibuat dengan mereaksikan timbal (II) oksida dengan asam asetat (Kalanjati, Pratiwi, dan Syakdiyah, 2014). Dosis paparan timbal asetat yang digunakan adalah 100 mg/200gBB/hari secara sonde peroral selama 14 hari (Jackie, Haleagrahara dan Chakravarthi, 2011)

3. Malondialdehid

Kadar MDA plasma merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid yang diukur menggunakan sampel darah yang diambil dari jantung hewan coba (*cardiac puncture*) (Wardani *et al.*, 2017). Kadar MDA dianalisis menggunakan metode TBARS dan diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm. (Zeb dan Ullah, 2016) (Wardani *et al.*, 2017)

1.4. Alat dan Bahan

4.4.1. Alat

1. Timbangan untuk menimbang BB tikus
2. Kandang tikus khusus (29 x 19 x 13 cm) dengan tempat pakan dan minum.
3. Alat pembedah tikus dan pengambilan sampel darah
 - a. Alat bedah minor (pinset anatomis, pinset chirurgis, klem arteri, klem mosquito, gunting)

- b. papan bedah
 - c. *handscoon*
 - d. spuit 5cc
4. Alat untuk mengukur kadar MDA
 - a. Tabung reaksi
 - b. Labu ukur
 - c. Gelas piala
 - d. Pipet mikro
 - e. *Sentrifuge*
 - f. Vorteks
 - g. Penangas air
 - h. Spektrofotometer BOECO Germany S-26
5. Sonde
6. Botol ekstrak meniran
7. Botol timbal asetat
8. Gelas ukur
9. Timbangan (Miligram *Balance*)
10. Alat untuk perlakuan setelah pengamatan
 - a. *Polybag*
 - b. Label

4.4.2. Bahan

1. 25 ekor tikus

Menggunakan *Rattus norvegicus*, jenis kelamin jantan karena dianggap memiliki organ fungsional dan reaksi

imunologis yang hampir sama dengan manusia sehingga diharapkan reaksi yang dihasilkan oleh hewan coba tersebut akan sama pula jika diterapkan pada manusia. *Rattus norvegicus* jantan secara hormonal lebih stabil dibandingkan dengan tikus betina, selain itu tikus jantan tidak mengalami masa kehamilan dan partus, umur 2-3 bulan, BB 200-250 gram dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif dan mata yang jernih. Tikus dipelihara di dalam kandang berukuran 29 x 30 x 40 cm yang terdiri dari 5 kandang dan tiap kandang berisi 4 ekor tikus.

2. Timbal asetat

Jumlah timbal asetat yang diperlukan secara keseluruhan
 $= 14 \text{ hari} \times 100 \text{ mg} \times 16 \text{ ekor} = 22.400 \text{ mg}$

3. Ekstrak Meniran

4. Pakan tikus berupa BR-1 dan air untuk minum

5. Pembuatan sediaan MDA

- a. EDTA 100 mM
- b. Trichloroacetic acid (TCA) 17,5%
- c. TBA 0,66%
- d. TCA 70%

1.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Ekstrak Meniran

Herba meniran (5 g) yang telah diserbuk direndam dengan 50 mL etanol-air dengan perbandingan 60:40, biarkan selama 24 jam, dalam botol meserasi yang berwarna gelap, sambil sekali-sekali

diaduk, maserat dipisahkan dan sisanya dimaserasi lagi beberapa kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama, sampai cairan terakhir tidak berwarna. Semua maserat dikumpulkan, diamkan selama dua hari, diendapkan, cairan atas diambil kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. (Martinus dan Riva'I, 2011).

4.5.2. Aklimatisasi

Sebanyak 20 ekor tikus jantan dipilih dan dipelihara selama 1 minggu sebagai tahap penyesuaian terhadap lingkungan. Pakan tikus yang diberikan adalah pakan standar BR-1 dan minum diberikan secara *ad libitum*. Selain itu, pada masa adaptasi ini dilakukan penimbangan berat badan tikus. (Ifada, Hermayanti, dan Hasan, 2016)

4.5.3. Penentuan Dosis Ekstrak Meniran

Ekstrak meniran memiliki efek sebagai antioksidan pada tikus yaitu pada dosis 200 mg/kgBB (Da'i *et al.*, 2016). Berdasarkan dosis efektif penelitian tersebut, maka pada penelitian ini digunakan dosis sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\frac{200 \text{ mg}}{1 \text{ kg BB}} &= \frac{200 \text{ mg}}{1000 \text{ g BB}} \\ &= \frac{20 \text{ mg} \times 2}{100 \text{ g BB} \times 2} \\ &= \frac{40 \text{ mg}}{200 \text{ gBB}}\end{aligned}$$

Sehingga, untuk menilai keefektifan ekstrak meniran dalam percobaan ini dilakukan orientasi tiga dosis dengan perhitungan sebagai berikut:

a. Dosis 1 : $\frac{1}{2} \times N = 20 \text{ mg}/200\text{gBB}$

b. Dosis 2 : $1 \times N = 40 \text{ mg}/200\text{gBB}$

c. Dosis 3 : $2 \times N = 80 \text{ mg}/200\text{gBB}$

4.5.4. Pembagian Kelompok Tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 20 ekor, terbagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

1. Kelompok 1 (K-): tanpa dipapar timbal asetat dan tanpa pemberian ekstrak meniran (kontrol negatif)
2. Kelompok 2 (K+): pemaparan timbal asetat sebanyak 100 mg/tikus (kontrol positif)
3. Kelompok 3 (P1): Pemaparan timbal asetat sebanyak 100 mg/tikus + ekstrak meniran 20mg/200gramBB/ hari
4. Kelompok 4 (P2): pemaparan timbal asetat sebanyak 100 mg/tikus + ekstrak meniran 40mg/200gramBB/hari
5. Kelompok 5 (P3): pemaparan timbal asetat sebanyak 100 mg/tikus + ekstrak meniran 80mg/200gramBB/hari

4.5.5. Pemaparan Timbal Asetat

Timbal asetat diberikan secara peroral dengan menggunakan sonde yaitu alat suntik dengan jarum yang ujungnya ditumpulkan. Sonde dimasukkan dengan hati – hati, kira – kira mencapai lambung. Timbal asetat diberikan dengan dosis 100 mg/200gramBB dengan pengenceran *aquadest* setiap hari selama 14 hari. (Jackie, Haleagrahara dan Chakravarthi, 2011)

4.5.6. Pemberian Ekstrak Meniran

Ekstrak meniran sesuai dosis di larutkan dengan air sampai 3 mL dan diberikan menggunakan sonde setiap setelah paparan timbal asetat selama 14 hari.

4.5.7. Manajemen Tikus Stres

Tikus yang stres dapat dilihat dari perubahan perilaku seperti berkurangnya aktivitas, nafsu makan turun, tidak mau minum, lebih banyak menjilat anggota badan, dan meningkatnya agresi serta vokalisasi (Sneddon *et al.*, 2014). Untuk menghindari stres tikus, luas lantai kandang lima ekor tikus dengan berat badan 250-300 gram adalah minimal 1.500 cm² sampai 1.800 cm². Ketinggian bagian atas kandang gram sekitar 22-24 cm. Kandang tikus harus dibuat dari plastik (misalnya *polypropylene*, *polycarbonate*, *polysulphone*, *poly etherimide*), lantai dan dinding bak dengan wire mesh pada puncaknya. Suhu ruangan kandang direkomendasikan berkisar antara 20-26 °C dengan kelembaban udara berkisar 40-70 %. Hindarkan kandang dengan paparan aspek lingkungan fisik seperti cahaya, suara, suhu, dan getaran yang berlebihan (Balitbangtan, 2016).

Untuk meminimalisasi rasa takut dan tertekan saat perlakuan, tikus dipegang dengan lembut dengan memegang seluruh tubuh secara tegas serta meminimalkan gerakan hewan dan harus diupayakan sedemikian rupa supaya tidak menyumbat lubang hidung. Menggelitik tikus (pada leher dan perut) akan merangsang 50 vokalisasi kHz yang berhubungan dengan kesenangan dan kondisi

emosional yang positif sehingga tikus akan lebih senang dan meningkatkan kesejahteraan (Balitbangtan, 2016).

4.5.8. Proses Anestesi dan Pembedahan Hewan Coba

1. Proses Anestesi :

Proses anestesi dilakukan satu persatu terhadap hewan coba dengan cara memasukan hewan ke toples yang berisi kapas yang sudah dicampur dengan kloroform. Kloroform adalah bahan yang mudah didapat. Anestesi dilakukan secara inhalasi pada hewan coba dengan dosis 0,67 ml per hewan coba, kemudian dihitung selama 60 detik menggunakan *stopwatch*, lalu diangkat dari toples pembiusan untuk dilakukan pembedahan (Alexandru, 2011).

2. Proses Pembedahan

Setelah tikus teranestesi dengan baik (keadaan pingsan), tikus diletakkan pada meja lilin dan keempat kaki tikus difiksasi terhadap meja lilin dengan menggunakan jarum pentul. Dengan menggunakan gunting bedah, dilakukan pembedahan pada abdomen hingga setinggi leher. Kemudian dengan menggunakan spuit 3 ml, darah tikus diambil dari ventrikel kiri sebanyak ± 3 ml (Alexandru, 2011). Sampel darah ditampung pada tabung yang telah diberi EDTA kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit (Wardani *et al.*, 2017).

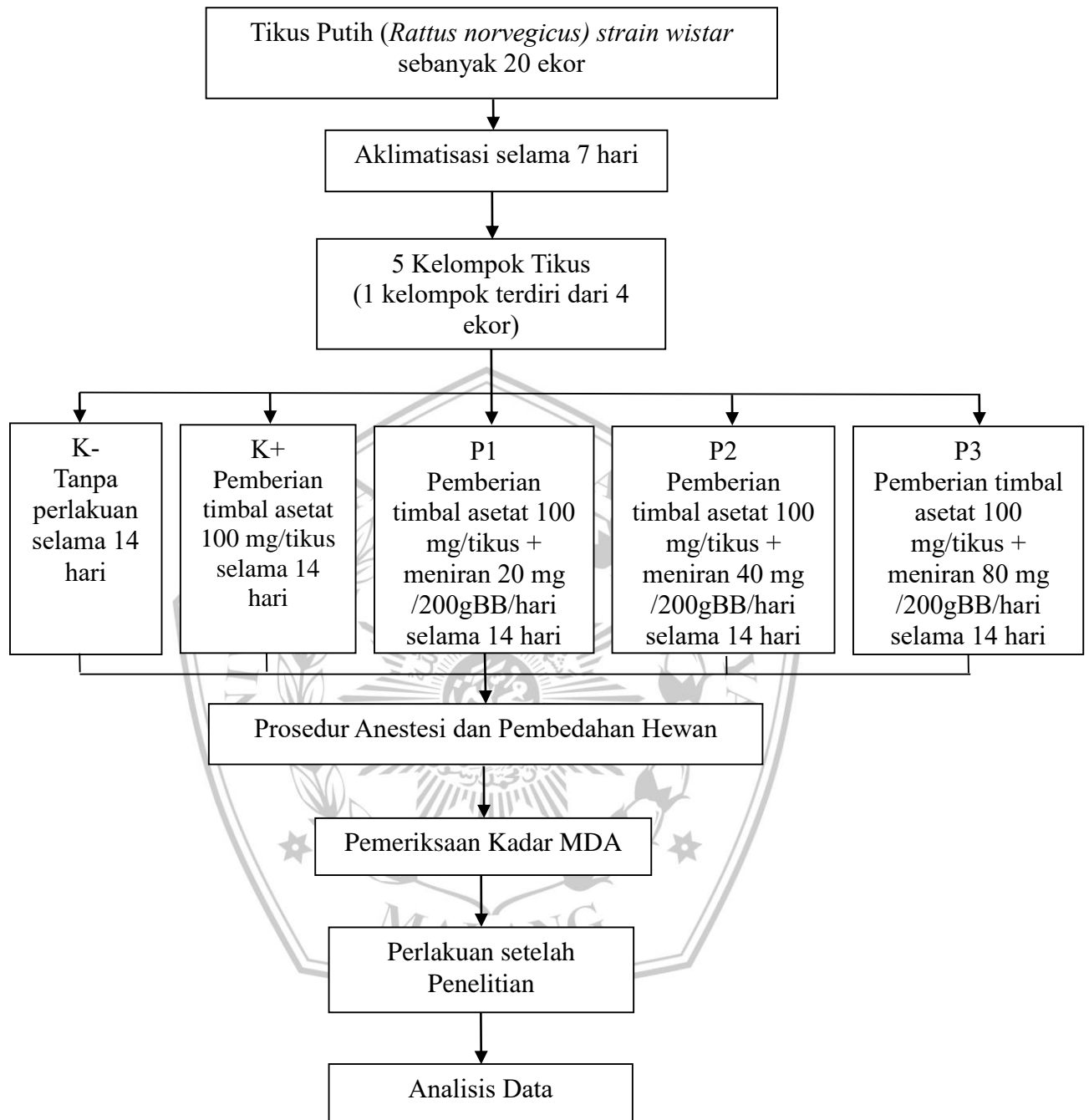
4.5.9. Pemeriksaan Kadar MDA

Darah yang sudah disentrifugasi diambil plasmanya dan disimpan dalam almari es dengan suhu -85°C . 150 μl sampel plasma ditambahkan 1 ml asam trikloroasetat (TCA) 17,5%, dan 1 ml 0,66% TBA dicampur dengan baik dengan vorteks, diinkubasi dalam air mendidih selama 15 menit, dan kemudian dibiarkan dingin. Setelah itu ditambahkan 1 ml TCA 70% dan campuran dibiarkan berdiri pada suhu kamar selama 20 menit. Hasil campuran disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 15 menit, dan diambil supernatannya untuk dilakukan pemindaian secara spektrofotometri dengan panjang gelombang 532 nm. (Zeb dan Ullah, 2016) (Wardani *et al.*, 2017)

4.5.10. Perlakuan Setelah Tindakan

Tikus dikumpulkan dan dibungkus dengan *polybag* untuk kemudian dikuburkan.

1.6. Alur Penelitian



1.7. Analisis Data

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Kemudian jika distribusi normal dan homogen, data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*, uji *Post-Hoc* dan uji Regresi linier yang pengolahannya menggunakan SPSS 24.0

4.7.1. Uji Normalitas

Data – data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis menggunakan uji normalitas dengan uji *Shapiro – Wilk*, karena besar sampel yang digunakan ≤ 50 . Uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah distribusi data normal. Sebaran data dinilai normal jika $p > 0,05$. Jika $p < 0,05$ maka data dapat ditransformasi.

4.7.2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas menggunakan uji varian Levene's test untuk mengetahui kehomogenan varian dari data - data yang diperoleh. Varian dinilai homogen jika $p > 0,05$.

4.7.3. Uji ANOVA dan *Post hoc Bonferroni*

Uji ANOVA dilakukan untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif, kontrol negatif dengan kelompok perlakuan, kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan. Sebelum uji ANOVA dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Apabila uji normalitas didapatkan sebaran data tidak normal setelah ditransformasi dapat menggunakan

uji non parametrik dengan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan uji *Post hoc Mann-Whitney*.

Jika hasil dari uji homogenitas varian data homogen ($p > 0,05$) maka dilanjutkan uji *Post hoc Bonferroni*. Namun jika varian data tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Post hoc Tamhane*. Uji *Post hoc Bonferroni* dilakukan untuk mengetahui variabel mana yang memiliki perbedaan signifikan.

4.7.4. Uji Regresi Linier

Uji Regresi Linier digunakan untuk mengetahui seberapa kuat pengaruh dosis ekstrak meniran terhadap kadar MDA plasma yang dipapar timbal asetat.

